

# コラーゲンにより惹起されるコイ栓球凝集反応に対する Sodium Nitroprussideの作用

松下映夫\*<sup>1</sup>・井上晋一\*<sup>1</sup>・田中竜介\*<sup>1</sup>・近藤昌和\*<sup>2</sup>・高橋幸則\*<sup>2</sup>

## Effect of Sodium Nitroprusside on Carp Thrombocyte Aggregation

Teruo Matsushita\*<sup>1</sup>, Shin-ichi Inoue\*<sup>1</sup>, Ryusuke Tanaka\*<sup>1</sup>,  
Masakazu Kondo\*<sup>2</sup>, Yukinori Takahashi\*<sup>2</sup>

Effect of sodium nitroprusside (SNP), a typical nitric oxide (NO) donor on the aggregation of carp (*Cyprinus carpio*) thrombocyte, in comparison with rat platelet, was studied by the whole blood method using an impedance aggregometer. Thrombocyte aggregation, induced in the carp by collagen, failed to be inhibited by SNP, while SNP partially but significantly inhibited collagen-induced platelet aggregation in the rat. This suggests that NO does not play an inhibitory role in the mechanism of carp thrombocyte aggregation, unlike the aggregation in rat platelets.

Key words : Aggregation, Blood cells, Collagen, Hamatology, Nucleotides

### 1 緒 言

魚類において、哺乳類の血小板に相当するのは栓球であり、止血に関与することが知られているが<sup>1,2)</sup>、栓球凝集の分子メカニズムについては、哺乳類の血小板と比較すると、研究があまり進んでいない。

著者らは既に、コイの栓球とラットの血小板の凝集惹起剤に対する反応性を検討し、コラーゲン処理により両者に共通して凝集反応が惹起されるが、アラキドン酸およびアデノシン5'-二リン酸 (ADP) に対して、コイ栓球では凝集反応が非常に起こりにくいか、あるいは全く起こらず、反応性の違いが存在することを報告した<sup>3)</sup>。

一方、cyclic AMP (cAMP) は細胞内情報伝達物質の一つで、哺乳類の血小板凝集反応に対し、抑制性に関与することが知られている<sup>4)</sup>。cAMPの誘導体であるN<sup>6</sup>, O<sup>2</sup>-dibutyl cyclicAMP (db-cAMP) は細胞膜を透過でき、細胞外に加えることにより細胞内cAMPを上昇させた場合と同じ効果を引き起こし、血小板の凝集反応を抑制するこ

とが報告されている<sup>5)</sup>。著者らは、コイの栓球においてもdb-cAMPがコラーゲンにより引き起こされる凝集を抑制することを明らかにし、cAMPが栓球の凝集メカニズムに抑制的に関与する可能性を示した<sup>6)</sup>。

cAMPと同様に、cyclic GMP (cGMP) も細胞内の情報伝達物質であり、哺乳類の血小板の凝集メカニズムにおいて抑制性に機能している<sup>4)</sup>。cGMPは、血管内皮細胞で生成されたnitric oxide (NO) が血小板の細胞膜を通過し、細胞質に存在するcGMP合成酵素であるグアニル酸シクラーゼ (GC) を活性化することにより生合成される<sup>7)</sup>。一方、血液中でそれ自身が化学的に分解され、NOを直接生じさせることのできるsodium nitroprusside (SNP) のような物質 (NOドナー) によってもcGMPが生合成され<sup>8)</sup>、哺乳類の血液では血小板凝集を抑制することが報告されている<sup>9, 10)</sup>。即ち、SNPの前処置により血小板凝集が抑制される現象が観察されれば、NO/cGMP系がその凝集メカニズムに抑制的に関与していることが推定できる。

本研究においては、魚類の栓球凝集の分子メカニズムを

2005年9月16日受付。Received September 16, 2005.

\* 1 水産大学校食品科学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

\* 2 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimonoseki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

より明確にするために、哺乳類の血小板と同様にコラーゲンに対して凝集反応性を示すコイの栓球を用いて、SNPの前処理によりコラーゲン惹起凝集反応が抑制されるか否かについて検討した。

## 2 材料および方法

### 2.1. 実験動物

水産大学校小野臨湖実験実習場（山口県宇部市）より搬入したマゴイ（体重500–1000g）を水温25℃で飼育して実験に供した。比較対照としてのラットはWistarラット（オス、10–14週齢、体重400–600g）を九動株（佐賀県鳥栖市）より購入し、室温23–26℃で飼育して実験に供した。

### 2.2. 採血

マゴイをキナルジン20ppmで麻酔し、尾柄部血管より注射器（10mlの注射筒、19ゲージ注射針）を用いて約9mlを採血した。なお、注射筒内には3.8%クエン酸ナトリウム含有生理食塩水（1ml）をあらかじめ加えておき、血液の凝固を防止した。

ラットをエーテル麻酔下で頸動脈にポリエチレンチューブ（内径15mm）のカニユーレを挿入し、約10–15mlの血液を試験管内に採取した。試験管内に1/9容の3.8%クエン酸ナトリウム含有生理食塩水を加えて血液の凝固を防止した。

採取したマゴイおよびラットの血液を室温に置き、凝集能の測定は採血後3時間以内に行った。

### 2.3. 凝集能の測定

マゴイの栓球およびラット血小板凝集の測定はChrono-log社（Haverton, PA, USA）の全血凝集計（Whole blood aggregometer ; 560-VS型）を用い、インピーダンス法（Electrical impedance measurement）<sup>11, 12)</sup>によって行った。なお、測定温度はマゴイおよびラットの場合にそれぞれ25および37℃で行った。いずれの場合にも、全血へのコラーゲン（1  $\mu$ g/ml）の添加により凝集反応が認められる<sup>3, 6)</sup>ので、今回も同様のコラーゲン濃度を用いてSNP前処置の効果を検討した。

血液1000  $\mu$ lを入れたキュベットを凝集計に装着し、レコーダーの基線が安定した後に、300mMのCaCl<sub>2</sub>を10  $\mu$ l添加し、約4–6分後にSNPまたは対照用溶媒（蒸留水）を10  $\mu$ l添加し、約4–6分間ブレインキュベートした。その後、凝集刺激剤であるコラーゲン（馬の臍由来、タイ

プI、モリヤ産業株）（10  $\mu$ l）を加えて凝集を惹起し、凝集の程度（インピーダンス（単位： $\Omega$ ）の変化）を経時的に記録し凝集曲線を得た。凝集能の値として、凝集曲線の最大凝集が得られた時点の値（最大インピーダンス）を採用した。なお、凝集惹起剤のコラーゲンはSKF緩衝液に溶解して反応系に添加した。

### 2.4. 統計処理

ANOVAおよびDunnet法による検定を実施した。

## 3 結果

マゴイの栓球において、コラーゲン（1  $\mu$ g/ml）で惹起された凝集反応は1, 3, 10mMのSNPの前処置により全く抑制されなかった（Fig.1）。一方、ラットの血小板凝集においては、コイの場合と異なり、0.3–10mMのSNPにより濃度依存的な抑制作用がみられ、3および10mMで部分的な抑制ではあるが、統計学的に有意な抑制が観察された（Fig.2）。

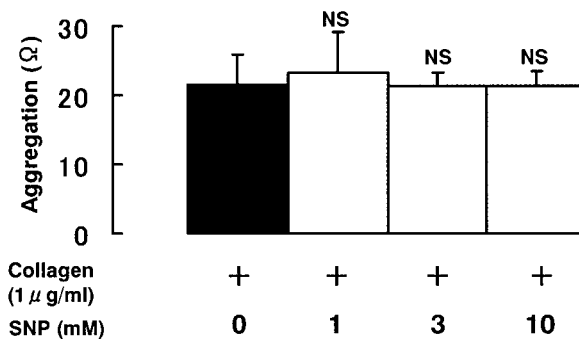


Fig. 1. Effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment (1–10mM) on carp thrombocyte aggregation induced by collagen (1  $\mu$ g/ml). Carp thrombocytes were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 25℃ for 4–6 min in the presence of vehicle (distilled water) or SNP (1, 3, 10mM) and collagen (1  $\mu$ g/ml) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum change of impedance ( $\Omega$ ) induced by the addition of collagen. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 5–15 determinations, respectively. NS means not significant vs vehicle control.

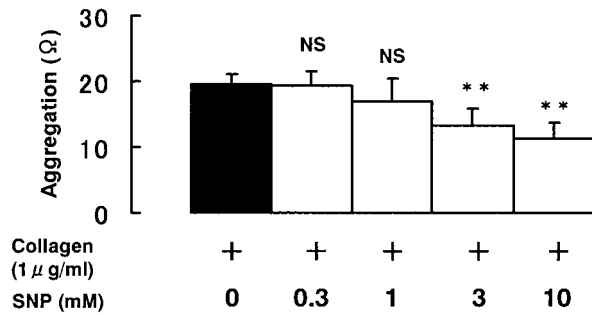


Fig. 2. Effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment (0.3~10mM) on rat platelet aggregation induced by collagen (1 μg/ml). Rat platelets were pre-incubated with 3 mM CaCl<sub>2</sub> (added) at 37°C for 4 - 6 min in the presence of vehicle (distilled water) or db-cAMP (0.3, 1, 3, 10mM) and collagen (1 μg/ml) was then added. The extent of aggregation was expressed as the maximum impedance change induced by the addition of collagen. Each column and vertical bar represent the mean and standard deviation of 5~22 determinations, respectively. \*\*P < 0.01 vs vehicle control. NS means not significant vs vehicle control.

#### 4 考 察

魚類の栓球凝集の分子メカニズムの一端を明らかにするために、コイの栓球が、哺乳類の血小板の場合と同様に sodium nitroprusside (SNP) の前処理によりコラーゲン惹起凝集反応が抑制されるか否かについて「全血凝集インピーダンス法」<sup>11, 12)</sup>を用いて検討した。

本研究では、魚類のコイにおいてコラーゲンにより惹起される栓球凝集が、ラットなど哺乳類の場合とは異なり、SNPにより抑制されないことを見いだした。したがって、NO/cGMP系はコイの栓球凝集メカニズムに抑制的には関与していない可能性が考えられる。既に著者らが報告したように、同じサイクリックヌクレオチドでも、cAMPの場合は、コイ栓球でもラット血小板の場合と同様に、凝集反応を抑制するメカニズムの存在が示唆されているので<sup>6)</sup>、コイとラットの凝集抑制メカニズムにおいては共通する点(cAMPの関与)と異なる点(NO/cGMP系の関与の有無)が存在することが明らかとなった。

ラットなど哺乳類の血小板では、その凝集メカニズムの詳細が明らかとなっている<sup>13)</sup>。種々の凝集惹起剤はホスホリパーゼC (PLC)を活性化して、inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)とdiacylglycerol (DG)を産生し、IP<sub>3</sub>は細胞内貯蔵部位からのCa<sup>2+</sup>の動員を惹起し、細胞内カルシウムイオン濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を上昇させる。この[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇シグナルは、種々のCa<sup>2+</sup>依存性経路に伝達され、例えば、

ミオシン軽鎖(myosin light chain ; MLC) が速やかにリン酸化される。このリン酸化を行なう酵素はMLCキナーゼであり、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリンにより活性化調節される。このMLCのリン酸化と続いて起こる脱リン酸化は、血小板の凝集など形態変化の制御に役割しているとされている。この血小板活性化時の情報伝達経路において、NO/cGMPは抑制的に関与することが知られている<sup>14, 15)</sup>。すなわち、NOはグアニル酸シクラーゼ(GC)に作用してcGMPを上昇させ、上昇したcGMPはcGMP依存性タンパクリン酸化酵素(cGK)を活性化する。この活性化されたcGKは、血小板の情報伝達経路にあるホスホリパーゼC (PLC)を阻害するため、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇が抑制される。その結果として、NO/cGMP系が血小板凝集の抑制に働くとされている。

本研究では、ラットとは異なりコイの栓球凝集ではSNPの添加によりコラーゲン凝集が全く抑制されないという結果が得られたが、コイの栓球において、1) SNPより生成したNOの標的であるGCが欠損しているか、哺乳類と異なりGCによりcGMPが産生されない可能性、あるいは、2) cGMPの作用点であるcGKが欠損しているか、cGKが哺乳類と異なるためPLC阻害が不十分である可能性など、ラットとのメカニズムの相違点の可能性が種々考えられる。しかしながら、コイでは、栓球のみならず他の細胞も含めて、GCやcGKなどの存在やその性状についてほとんど検討・報告されていないので、メカニズムにおける相違点がどこにあるのかは今後の検討課題である。

コイでは、血管系の収縮弛緩調節におけるNOの関与の有無について検討した報告がひとつだけ存在する<sup>16)</sup>。直接的にNOを生成させる試薬(NOドナー)であるSNPにおいても、また、血管内皮細胞を刺激して間接的にNOを生合成させるブラジキニンやヒスタミンでも、それらの処置によりコイの血管の弛緩は引き起こされないが、ラットの血管(大動脈)ではこれらの処置により弛緩を引き起こすこと、そしてSNPはラットの血管でcGMPを上昇させるが、コイの血管では上昇させないので、コイでは血管を弛緩させるメカニズムにNO/cGMP系は関与していないとしている<sup>16)</sup>。この結果は、コイ栓球における本研究の結果と同様である。

血管の収縮弛緩調節におけるNO/cGMP系の関与の有無についてはニジマス<sup>15-17)</sup>、ウナギ<sup>18, 19)</sup>、サメ類の*Squalus acanthias*<sup>20)</sup>、icefish (*Chionodraco hamatus*)<sup>21)</sup>などの魚種においても検討されている。これらの報告では、哺乳類でみられるような血管内皮細胞由来のNOが生成されてNO/

cGMP系が血管弛緩・血圧低下に関与している場合もあるが<sup>15, 17, 18, 20, 21)</sup>、同じ種でも条件によっては関与していないという結果もあり<sup>16, 18-20)</sup>、その解釈は複雑であり、未だはっきりしない点が多い。

## 文 献

- 1) 魚類生理学の基礎 (会田勝美 編), 恒星社厚生閣, 東京都, pp. 233-249 (2002).
- 2) E. E. Stokes and B. G. Firkin : Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portus-jacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. *Br. J. Haematol.*, **20**, 427-435 (1971).
- 3) 松下映夫・田中竜介・近藤昌和・高橋幸則・宮本美津子・車谷 元: コイの栓球とラット血小板の凝集反応の比較とプロスタグランジン系物質の関与について. *水産大学校研究報告*, **52**(4), 153-159 (2004).
- 4) J. L. Daniel, B. Ashby and F. M. Pulcinelli: Platelet signaling: cAMP and cGMP. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermylen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 290-303 (2002).
- 5) T. Y. Wang, C. V. Hussey and J. C. Grancis: Effect of dibutyl cyclic adenosine monophosphate and prostaglandin E<sub>1</sub> on platelet aggregation and shape changes. *Am. J. Clin. Pathol.*, **67**, 362-367 (1977).
- 6) 松下映夫・田中竜介・近藤昌和・高橋幸則・宮本美津子・車谷 元: コラーゲンにより惹起されるコイ栓球凝集反応のDibutyl Cyclic AMPによる抑制. *水産大学校研究報告*, **52**(4), 161-164 (2004).
- 7) K. A. Lucas, G. M. Pitari, S. Kazerounian, I. Ruiz-Stewart, J. Park, S. Shulz, K. P. Chepenik, S. A. Waldman: Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* **52**(3), 375-414 (2000).
- 8) W. A. Buechler, K. Ivanova, G. Wolfram, C. Drummer, J. M. Heim, R. Gerzer : Soluble guanylyl cyclase and platelet function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **714**, 151-157 (1994).
- 9) G. Anfossi, I. Russo, P. Massucco, L. Mattiello, A. Balbo, F. Cavalot, M. Trovati : Studies on inhibition of human platelet function by sodium nitroprusside. Kinetic evaluation of the effect on aggregation and cyclic nucleotide content. *Thromb. Res.* **102**(4), 319-330 (2001).
- 10) E. K. Jang, J. E. Azzam, N. T. Dickinson, M. M. Davidson, R. J. Haslam : Roles for both cyclic GMP and cyclic AMP in the inhibition of collagen-induced platelet aggregation by sodium nitroprusside. *Br. J. Haematol.* **117**(3), 664-675 (2002).
- 11) D. C. Cardinal and R. J. Flower : The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J. Pharmacol. Methods*, **3**, 135-158 (1980).
- 12) P. Thiagarajan and K. K. Wu : In vitro assay for evaluating platelet function. In *Platelets in Thrombotic and Non-thrombotic Disorders* (ed. by P. Gresele, C. P. Page, V. Fuster and J. Vermylen), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp.459-470 (2002).
- 13) 血小板生物学 (池田康夫, 丸山征郎 編), メディカルレビュー社, 東京都, pp. 263-272, pp. 327-332 (2004).
- 14) K. H. Park, K. H. Kim, M. S. Choi, S. H. Choi, J. M. Yoon, Y. G. Kim : Cyclooxygenase-derived products, rather than nitric oxide, are endothelium-derived relaxing factor(s) in the ventral aorta of carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **127**(1), 89-98 (2000).
- 15) V. Soderstrom, P. Hylland, G. E. Nilsson : Nitric oxide synthase inhibitor blocks acetylcholine induced increase in brain blood flow in rainbow trout. *Neurosci. Lett.* **197**(3), 191-194 (1995).
- 16) V. Soderstrom, G. E. Nilsson : Brain blood flow during hypercapnia in fish: no role of nitric oxide. *Brain Res.* **857**(1-2), 207-211 (2000).
- 17) L. Haraldsen, V. Soderstrom-Lauritzen, G. E. Nilsson : Oxytocin stimulates cerebral blood flow in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through a nitric oxide dependent mechanism. *Brain Res.* **929**(1), 10-14 (2002).
- 18) D. Pellegrino, E. Sprovieri, R. Mazza, D. J. Randall, B. Tota : Nitric oxide-cGMP-mediated vasoconstriction and effects of acetylcholine in the branchial circulation of the eel. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **132**(2), 447-457 (2002).
- 19) B. L. Jennings, B. R. Broughton, J. A. Donald : Nitric oxide control of the dorsal aorta and the intestinal vein of the Australian short-finned eel *Anguilla australis*. *J. Exp. Biol.* **207**(Pt 8), 1295-1303 (2004).

- 20) K. E. Swenson, R. L. Eveland, M. T. Gladwin, E. R. Swenson : Nitric oxide (NO) in normal and hypoxic vascular regulation of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* **303** (2), 154-160 (2005).
- 21) D. Pellegrino, B. Tota : Control of cardiovascular function in the icefish *Chionodraco hamatus*: involvement of serotonin and nitric oxide. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **134** (2), 471-480 (2003).
- 22) E. Noack, M. Feelisch : Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. *Basic Res. Cardiol.* **86** (Suppl 2), 37-50 (1991).
- 23) S. Fukuyama, Y. Kita, Y. Hirasawa, T. Azuma, A. Sato, N. Morokoshi, S. Koda, T. Yasuda, S. Oka, H. Sakurai : A new nitric oxide (NO) releaser : spontaneous NO release from FK409. *Free Radical Res.* **23** (5), 443-452 (1995).